

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
非定型 BSE（牛海綿状脳症）に対する安全対策等に関する研究
（H26-食品-一般-004）

総合研究報告書

研究代表者 堀内 基広 北海道大学大学院獣医学研究科

研究要旨

英国で発生して世界各地に広がった BSE（定型 BSE, C-BSE）は大きな社会問題となったが、飼料規制などの管理措置が機能した結果、その発生は制御下にある。しかし、能動サーベイランスの結果、C-BSE とは性質が異なる BSE（非定型 BSE, L-BSE および H-BSE）が、主に高齢牛で発見され、ヒトへの感染リスクや C-BSE の原因となる可能性が指摘されている。本研究では、食品を介する非定型 BSE の感染拡大を防ぐための安全対策等に貢献することを目標として、これまでに培った技術・経験および科学的知見を活用して、1) 非定型 BSE 感染動物における感染病態機序の解明に資する研究、2) 非定型 BSE のヒトへのリスクの推定に資する研究、3) 潜在的な非定型 BSE の存在リスクの推定、非定型 BSE が C-BSE の起源となる可能性の推定、に資する研究を進め、以下に述べる研究成果が得られた。

L-BSE 脳内接種牛の臨床症状と PrP^{Sc} 検出時期を調べた結果、臨床症状が出現する 6ヶ月前、病末期の約 11ヶ月前には PrP^{Sc} が検出されることを明らかにした。L-BSE の脳内分布の解析から、原因不明の死亡牛の検査部位として嗅脚などが適していることを示した。BSE 解析用のモデルとして、C-BSE モルモット馴化株、L-BSE ハムスター馴化株を作出した。C-BSE の PrP^{Sc} が熱処理により PrP^{Sc} の分子サイズが変化するという、これまで報告がない生化学的特徴を見出した。プリオン感染動物脳からプリオン感染神経細胞を同定・分離する方法を世界で初めて確立した。C-, L-, および H-BSE プリオン感染 TgBovPrP の比較から、3種の BSE プリオンに共通した宿主応答、およびそれぞれの BSE プリオンに特徴的な宿主応答があることを明らかにした。

カニクイザルを用いた L-BSE の経口感染試験から、L-BSE は経口的にヒトに感染するリスクがあることを明らかにした。ヒト PrP 過発現マウス (TgHuPrP) マを用いた伝達試験の結果から、ヒトの BSE プリオンの感受性は、L-BSE > C-BSE > H-BSE と推測され、L-BSE は C-BSE よりもヒトで増殖し易く、H-BSE のヒトへの感染リスクは低いと考えられた。L-BSE 感染牛の骨格筋（上腕三頭筋、半腱様筋、大腰筋、最長筋）に脳の 1/10,000 程度の感染価が存在することを明らかにした。BSE 検査に使用されている市販キットが、L-, および H-BSE ウシの摘発に有効であることを確認した。

rCerPrP を用いることで、C-BSE と L-BSE プリオンの高感度検出および鑑別を一回の反応で実施可能な実用的な RT-QuIC 法を確立した。rMoPrP と rHaPrP に対する C-BSE と L-BSE の反応性の差を利用して、両者を高精度に鑑別する方法を確立した。しかし、C-, L-, および H-BSE を 1度で検出・鑑別する方法の確立には至らなかった。L-BSE プリオンが、単純な加熱や酸・アルカリ等の物理・化学的処理によって C-BSE 様のプリオンに変化する可能性は低いと考えられた。

研究分担者

新 竜一郎（宮崎大学 医学部 感染症学講座教授）

柴田 宏昭（自治医科大学 先端医療技術開発センター 共同利用コーディネーター部門 講師）

飛梅 実（国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官）

萩原 健一（国立感染症研究所 細胞生化学部 第1室室長）

長谷部 理絵（北海道大学 大学院獣医学研究科 獣医衛生学教室 講師）

福田 茂夫（北海道総合研究機構 畜産試験場 基盤研究部 畜産工学グループ 研究主任）

室井 喜景（帯広畜産大学 畜産学部 基礎獣医学研究部門 准教授）

岩丸 祥史（国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 上級研究員）

A．研究目的

英国で発生して世界各地に広がった BSE（定型 BSE, C-BSE）は大きな社会問題となったが、飼料規制などの管理措置が機能した結果、その発生は制御下にある。しかし、能動サーベイランスの結果、C-BSE とは性質が異なる BSE（非定型 BSE, L-BSE, H-BSE）が、主に高齢牛で発見され、ヒトへの感染リスクや C-BSE の原因となる可能性が指摘されている。非定型 BSE は自然発生する疾病の可能性があり、実験的に牛やヒト PrP 遺伝子発現マウスに伝達することから、牛を飼養する国と地域の共通の問題として、グローバルなレベルで、感染拡大リスクを考慮した長期的な対策が必要である。しかし、リスク評価および適切な管理措置の策定に必要な科学的知見が乏しいのが現状である。

先の食品の安心・安全確保推進研究事業（平成 20-22 年度、平成 23-25 年度）の実績から、サル、

ウシおよび各種モデル動物を用いる感染実験によるプリオン病の病態解析手法、異常型プリオンタンパク質（PrP^{Sc}）の高感度検出法などの技術が格段に向上している。本研究では、食品を介する非定型 BSE の感染拡大を防ぐための安全対策等に貢献することを目標として、これまでに培った技術・経験および科学的知見を活用して、項目 1) 非定型 BSE 感染動物における感染病態機序の解明に資する研究、項目 2) 非定型 BSE のヒトへのリスクの推定に資する研究、項目 3) 潜在的な非定型 BSE の存在リスクの推定、非定型 BSE が C-BSE の起源となる可能性の推定、に資する研究を進める。

本研究で取り組む、非定型 BSE 感染牛の中樞神経系における PrP^{Sc} の出現部位と時期の解析、牛可食部位における感染価の解析（項目 1）、霊長類を用いた非定型 BSE の感染実験（項目 2）、潜在的な非定型 BSE の調査（項目 3）から得られる成果は、非定型 BSE のヒトへの感染リスクを考慮した BSE 管理措置の策定に必要な科学的知見であり、食品健康影響評価および食品衛生行政に貢献する。さらに、得られる研究リソースおよび技術は、プリオン病の診断・治療法の開発、プリオンの検出法に応用可能であり、広く保健医療に貢献する。また、非定型 BSE の病態解明は、難解かつ不明な点が多いことが最大の不安要因であるプリオン病に対する、消費者の不安・懸念の払拭にも役立つ。

B．研究方法

1) 非定型 BSE 感染動物における感染病態機序の解明に資する研究

- ・ L-および H-BSE 脳内接種牛における PrP^{Sc} の脳内出現部位を経時的に解析して、発症前に PrP^{Sc} が検出される時期や部位を明らかにする。
- ・ C-BSE, L-BSE の病態解析モデル系として、遺伝子組換え動物以外に、野生型動物を用いる病態解析系の確立を目指す。
- ・ C-BSE および非定型 BSE 由来 PrP^{Sc} の蛋白化学的な解析により両者の相違に関する知見を集積する。
- ・ 組織切片上での PrP^{Sc} 特異染色法(食品の安全性確保推進研究事業[平成 23-25 年実施])

で確立)を用いて、C-, L-, および H-BSE 感染牛および感染動物の神経病変を詳細に解析して、非定型 BSE の神経病変の特徴を明らかにする。

- ・ プリオン病の新規病態解析技術として、PrP^{Sc} 特異染色法を応用して、プリオン感染動物の中枢神経系組織からプリオン感染神経細胞を分取する方法を確立する。
- ・ C-, L-, および H-BSE プリオン感染ウシ PrP 過発現マウス (TgBovPrP) の中枢神経系組織の網羅的遺伝子発現解析により、各々の病原体により引き起こされる病態の相違を明らかにする。

2) 非定型 BSE のヒトへのリスクの推定に資する研究

- ・ 先の食品の安全性確保推進研究事業 (平成 23-25 年実施) で開始した、L-BSE 経口接種カニクイザルの、臨床経過の観察、運動機能試験、脳波測定による神経機能解析を継続する。L-BSE の実験モデル化のために実施中の脳内接種連続継代中のサルについても、同様に実施する。
- ・ H-BSE のヒトへのリスクの推定のために、カニクイザルの経口接種および脳内接種試験を新規に開始して (2-4 頭使用予定) 経過観察、血液および脳脊髄液の採取を行う。
- ・ 先の食品の安全性確保推進研究事業 (平成 23-25 年実施) から継続している、C-BSE 経口接種カニクイザル、および輸血による C-BSE の伝播リスクを検証するために C-BSE 感染カニクイザルの血液を輸血したカニクイザルの、臨床経過の観察、運動機能試験、脳波測定による神経機能解析を継続する。
- ・ ヒト PrP 過発現マウス (TgHuPrP) を新たに作製し、C-, L-, および H-BSE を脳内接種して伝達性を調べることで、ヒトが非定型 BSE に感受性であるかを推測する。
- ・ 市販 BSE 検査キットの非定型 BSE の検出精度を精査する。
- ・ L-および H-BSE 実験感染牛の発症牛の可食部位に、検出しうる PrP^{Sc} およびプリオン感染価が存在するか否かを、免疫組織化学および TgBovPrP を用いるバイオアッセイに

より調べる。

3) 潜在的な非定型 BSE の存在リスクの推定、非定型 BSE が C-BSE の起源となる可能性の推定

- ・ C-BSE と非定型 BSE を一回の反応で、検出感度を損なわずに検出でき、かつ鑑別可能な、実用レベルの RT-QuIC 法を構築する。
- ・ 非定型 BSE 試料の熱処理や化学処理が C-BSE を誘発する可能性を検討する。
- ・ L-BSE や C-BSE の病原学的性状が異種動物伝達により変化するかについて検討する。

(倫理面への配慮)

各々の研究分担者が所属する機関での動物実験委員会等で審査を受けた動物実験プロトコル等に従い、実験動物の福祉および動物実験倫理に十分配慮して動物実験を実施した。感染症病原体等の取り扱いは、各々の機関の病原微生物等安全管理委員会あるいはバイオセーフティ委員会などの承認を得て実施した。

C. 研究結果

1) 非定型 BSE 感染動物における感染病態機序の解明

1-1) L-BSE 感染牛の病態解析

L-BSE を脳内接種した牛を接種後 4.7 ヶ月で病理解剖し、中枢神経系組織における PrP^{Sc} の蓄積を調べた結果、中脳、橋および延髄にわずかな PrP^{Sc} の蓄積を確認した。接種後 1.7 および 4.2 ヶ月で安楽殺した各一頭の牛の脳内では明瞭な PrP^{Sc} の蓄積は検出されなかったが、接種後 7.5 および 9.1 ヶ月では、脳幹部の他、小脳、視床に PrP^{Sc} が検出された。脳内接種による L-BSE 感染牛の臨床症状は接種後 11 ヶ月頃から確認されることから、臨床症状が出現する 6 ヶ月前頃には PrP^{Sc} が検出されるようになることが示唆された。

C-および L-BSE 感染牛の脳組織における PrP^{Sc} の出現部位と時期を比較したところ、延髄および中脳では、L-BSE は接種後 5 ヶ月で、C-BSE は 10 か月で PrP^{Sc} が検出され、L-BSE

が5ヶ月早く PrP^{Sc} が検出された。小脳皮質、大脳皮質前頭部ではL-BSEで接種後11ヶ月に対しC-BSEで接種後18ヶ月、19ヶ月に検出され、それぞれL-BSEが早く蓄積した。嗅脚では、L-BSEは接種後7ヶ月、C-BSEでは接種後19ヶ月で検出され、線条体では、L-BSEは9ヶ月、C-BSEは16ヶ月で検出された。L-BSEではC-BSEよりも早くから、かつ脳の広範囲にわたりPrP^{Sc}が検出されることが判明した。

H-BSE感染牛の解析は、平成28年度8-9月に道東で発生した台風被害により研究期間内での実施が困難となった。

1-2) L-BSEの病態解析モデルの確立と病態の解析

C-BSEはモルモットへ伝達したが、ハムスターへは伝達しなかった。逆に、L-BSEはハムスターに伝達したが、モルモットへは伝達しなかった。その結果、C-BSEモルモット馴化株(C-BSE/gu)、L-BSEハムスター馴化株(L-BSE/ham)が作出できた。そこで、これらの病理学的解析を行った。L-BSE/ham接種ハムスターでは末梢組織でPrP^{Sc}の蓄積が認められず、中枢神経系組織で血管周囲や脳室周囲器官でPrP^{Sc}の蓄積が認められることから、脳脊髄液を介して、あるいは血行性に中枢神経系組織内で蓄積部位が拡大することが示唆された。

C-BSEモルモット馴化株(C-BSE/gu)、L-BSEハムスター馴化株(L-BSE/ham)を用いて、C-BSE/guをハムスターに、L-BSE/hamをモルモットに接種して、異種間伝達に伴うプリオンの性状変化を解析した。C-BSE/gu感染モルモットでは、顆粒細胞の減数と分子層の菲薄化による小脳皮質の萎縮が顕著であった。また、脳全体にPrP^{Sc}の沈着が認められ、プラーク状沈着が特徴的であった。L-BSE/ham感染ハムスターでは脳全体にび慢性のPrP^{Sc}の沈着が認められ、微細顆粒状や血管周囲への小斑状の沈着が特徴的であった。異種間伝播モデルであるC-BSE/gu感染ハムスターでは、脳全体にPrP^{Sc}の沈着が認められ、海馬、間脳、大脳へのび慢性、放射状沈着が主であった。C-BSE/gu感染ハムスターでは、C-BSE/gu感染モルモットでみられる特徴的な小脳病変は形成されず、L-BSE/ham感染ハムスターでみられる特徴的な沈着分布や沈着パターンの多くがみられた。従って、C-BSE/L-BSEの実験的異種間伝播に

おける病理学的特徴は、動物種とプリオン株の両方の影響を受けるものと考えられる。

1-3) BSE由来PrP^{Sc}のタンパク質化学性状の解析

PrP^{Sc}の温度およびpH処理に対する性状変化を調べた。C-BSE由来PrP^{Sc}は今回調べた範囲のpH・温度ではプロテアーゼへの抵抗性を維持していたが、通常の消化条件(37°C)と比較して、高温消化条件では、プロテアーゼ抵抗性のPrP^{Sc}断片の分離量が大きくなることを見出した。この変化はC-BSE感染ウシ脳組織では確認できるが、C-BSEプリオンを異種動物(カニクイザルやマウス)へ伝播・馴化させると認められなくなることから、これまで報告がない生化学性状であるが、C-BSEプリオン株に特徴的な生化学マーカーとして使用できる可能性がある興味深い知見である。

1-4) 病態解析ツールとしてのPrP^{Sc}特異抗体mAb8D5とmAb132の有用性の検討

異なるエピトープを認識する2種の抗PrP抗体、mAb8D5と132を用いたPrP^{Sc}特異的免疫染色法の応用性を検討するために、牛およびTgBovPrPの脳組織における両抗体の反応性を検討した。mAb8D5は、非感染牛脳組織でも、橋、視床および視床下部の少数の細胞の細胞質にもシグナルが検出されたことから、牛脳組織の特定の領域ではPrP^CとPrP^{Sc}の区別が困難である可能性が示唆された。mAb132は非感染牛脳組織でシグナルが検出されなかったことから、ウシ脳組織におけるPrP^{Sc}の検出に有用であると考えられる。mAb132はPrP^Cの局所の濃度が高いとPrP^Cと反応する。非感染TgBovPrPの脳では嗅球の一部に、感染マウスとは区別できないmAb132の強いシグナルが認められたが、嗅球以外の部位では、PrP^Cの過発現の影響を受けずにPrP^{Sc}の検出が可能と思われた。

1-5) プリオン病の新規病態解析技術の確立

プリオン感染マウスから、神経細胞マーカーとPrP^{Sc}の二重染色により、フローサイトメーターを用いて、プリオン感染神経細胞を同定する方法を確立した。この方法は世界で初めての報告であり、セルソーターを用いて、プリオン感染動物の脳組織からプリオンに感染した神経細胞を分離することが可能となった。

1-6) C-, L- および H-BSE プリオン感染 TgBovPrP の中枢神経系組織のトランスクリプトーム

まず、宿主応答が明らかに認められる時期として、遺伝子発現パターンが、陰性対照の非感染マウスと比較して異なるクラスターに分離できる日を評価の目安とした。そうすると、L-BSE では、接種後 167 日、C-BSE では接種後 204 日、H-BSE では接種後 253 日までは、非感染マウスと区別できなかったことから、明瞭な宿主応答が生じるのは、これらの時点より後になると考えられた。

K-mean クラスタリングにより分類されたクラスターのうち、クラスター C-1 は、C-, L-, および H-BSE プリオン感染 TgBovPrP ともに病末期に遺伝子発現が上昇する遺伝子群であった (184 遺伝子)。共通して発現が上昇する遺伝子群には、ミクログリアで発現が上昇する自然免疫系に関連する遺伝子が多く含まれていた。これに対し、C-2 (212 遺伝子)、C-3 (179 遺伝子)、および C-4 (200 遺伝子) はそれぞれ、L-BSE, C-BSE, あるいは H-BSE プリオン感染 TgBovPrP でのみ発現が上昇する傾向にある遺伝子から構成されるグループであり、各々の病態が異なることも明らかとなった。

2) 非定型 BSE のヒトへのリスクの推定

2-1) L-BSE 感染サルの病態解析

L-BSE (非定型 BSE JP/24 佐世保) では初代接種より、短い潜伏期間で発症が認められ、C-BSE に比べて、発症後の神経症状進行は緩徐であった。ほぼ同様の臨床症状ステージで解剖した安楽死後の MRI 画像では C-BSE 接種サルに比べて、L-BSE 接種サルの脳室拡張が顕著で、脳萎縮が進行していた。

PMCA 法の増幅条件を検討し、L-BSE 感染サル由来 PrP^{Sc} の超高感度検出が可能になった。発症前の L-BSE 脳内接種サルの脳脊髄液、尿や唾液中にも、PrP^{Sc} が検出されることから、PMCA 法を用いて、経口接種サルの体液を経時的に検査することで、感染成立の有無を調べるのが可能となった。

平成 27 年度、投与後約 3.5 年目の唾液から PrP^{Sc} が検出されたが、同一個体ではその後採

材した唾液からは PrP^{Sc} は検出されなかった。また、平成 28 年度、投与後 3.7 年の個体の血漿から一過性に PrP^{Sc} を検出した。投与後 5.5 年を経過した現時点で臨床症状は認められていないが、経口投与した 2 頭のサルともに体液から PrP^{Sc} が検出されたこと、および、L-BSE を脳内接種したカニクイザルでも発症前の尿、唾液、脳脊髄液から PrP^{Sc} が検出できることから、L-BSE は経口的にヒトに感染するリスクがあると判断すべきである。

この 2 頭については、平成 28 年度末に安楽死を行い、組織・臓器からの PrP^{Sc} 検出を行い、ヒトに近い真猿類での L-BSE 経口感染リスクを評価する。

2-2) H-BSE 感染サルの病態解析

H-BSE のサルへの伝播を確認するための脳内接種と食を通じてのヒトへの感染リスクを評価するための経口投与の実験を開始した。いずれも接種してから 1.4 年を経過したが、現在まで、臨床的に異常はない。潜伏期を考慮すると、平成 29 年度以降の実験継続が必要である。

2-3) C-BSE の経口および輸血による伝播リスクの評価

C-BSE 感染牛脳乳剤のカニクイザルへの経口投与、および C-BSE 感染牛脳乳剤を脳内接種されて感染したカニクイザルの血液をカニクイザルに輸血する輸血実験を行い経過観察を継続してきた。途中、未発症の 2 頭を安楽死したが、残りのサルは発症が確認できないまま、それぞれ 13.5 年目、10.4 年目に安楽死した。経口接種群では、定期的に採材していた体液類からは PrP^{Sc} は検出されなかった。安楽死直後の脳 MRI 像では、脳室拡張に伴う脳萎縮は見られなかった。また輸血実験群のサルの神経及び末梢組織を高感度検出系で検査したが、調べた組織からは PrP^{Sc} は検出されなかった。

2-4) ヒト PrP 過発現マウス (TgHuPrP) を用いたヒトの非定型 BSE 感受性の推定

ヒト型 PrP 遺伝子 (コドン 129 番目メチオニン) を過剰発現する TgHuPrP を 4 系統 (#21、#38、#51、#07) 作製した。すべての系統は内因性のマウス PrP 遺伝子をノックアウト化した。ヒト 129M PrP^C の脳での発現量は、野生型マウスと比べて、#21 で 4 倍、#38 で 4 倍、#51

で 1.5 倍、#07 で 1 倍であった。

これらの TgHuPrP に、C-, L-, および H-BSE プリオンを脳内接種した。L-BSE は TgHuPrP を高発現する Tg マウスには attack rate 100% で伝達したが、低発現する Tg マウスへは伝達したが attack rate は低かった。C-BSE は HuPrP を高発現する Tg マウスに attack rate が低いながら伝達が認められた。しかし H-BSE はいずれの Tg にも伝達しなかった。

従って、L-BSE はヒトへの伝達効率が C-BSE よりも高いことが示唆された。

2-5) 食肉衛生検査所等での BSE スクリーニングに使用されている迅速検査キットの性能評価

当該の検査キットが L-, および H-BSE 罹患ウシを適切に摘発できることを示した。欧州の評価基準に照らしても BSE 罹患ウシの摘発に有効と判断される結果となった。

2-6) L-および H-BSE 実験感染牛の発症牛の可食部位における PrP^{Sc} およびプリオン感染価の解析

L-BSE 臨床症状期の牛の筋組織を抗プリオンタンパク質抗体 (F99/97.6.1: VMRD, Pullman, WA, USA) の免疫組織化学染色で解析すると、筋組織の筋紡錘で PrP^{Sc} 陽性となった。L-BSE 感染牛の可食部 (骨格筋: 上腕三頭筋、半腱様筋、大腰筋、最長筋) の乳剤を TgBovPrP に接種したところ、全ての試料でマウスの発症が認められた。平成 26 年度に作成した L-BSE の感染価-潜伏期標準曲線から、感染価を推定した結果、これらの可食部には、脳の 1/10,000 程度の感染価が存在することが判明した。本実験で調べた 3 頭の L-BSE 実験感染牛で同様の結果が得られた。

また、H-BSE の感染価を測定するための感染価-潜伏期標準曲線を作成した。これにより、H-BSE 感染牛の可食部の感染価の定量解析が可能となった。

3) 潜在的な非定型 BSE の存在リスクの推定、非定型 BSE が C-BSE の起源となる可能性の推定

3-1) C-BSE と非定型 BSE を一回の反応で、検

出感・鑑別可能な RT-QuIC 法の構築

rCerPrP を基質として用いた場合、C-BSE および L-BSE とともに、被検試料の脳乳剤濃度が最高となる 10^{-3} 希釈でも陽性となり、L-BSE および C-BSE とともに 10^{-7} 希釈まで再現性良く陽性となることから、rCerPrP を用いた RT-QuIC 法は、ELISA や WB よりも 10,000 以上検出感度が高く、TgBovPrP を用いたバイオアッセイよりも 10 倍程度感度が高いことが確認できた。H-BSE プリオンも $10^{-3} \sim 10^{-8}$ 希釈で検出可能であった。

この反応系に、終濃度 0.1% となるように非感染牛脳乳剤を加えると、L-BSE の検出限界は 10^{-8} と 1 段階上昇したが、C-BSE の検出限界は 10^{-3} までと著しく低下した。従って、rCerPrP を用いた RT-QuIC 反応を、非感染牛脳乳剤存在/非存在下で行うことで、一回の RT-QuIC 法で、C-BSE と L-BSE の高感度検出と鑑別が可能となった。しかし、C-, L-, および H-BSE の 3 種を鑑別可能な方法の確立には至らなかった。

rCerPrP 以外に、マウス、ハムスター、ウシ、およびハタネズミの組換え PrP を使用したが、被検試料の脳乳剤濃度が最高となる 10^{-3} 希釈でも安定して陽性となり、かつ 10^{-7} 希釈まで再現性良く陽性となるのは rCerPrP を基質とした RT-QuIC であった。

3-2) L-BSE と C-BSE の RT-QuIC 法における rMoPrP、rHaPrP へのシード活性の違い

rMoPrP と rHaPrP を反応基質として用い、L-, C-BSE をそれぞれシードとして RT-QuIC 法を実施すると、L-BSE は rMoPrP、rHaPrP の両者に対してシード活性を示したのに対して C-BSE は rHaPrP に全く活性を示さなかった。さらに L-BSE、C-BSE をシードとした RT-QuIC 法の継代を継続 (最初の反応を Round-1 とし、その反応液の希釈液の一部を次の反応 [Round-2] のシードとして RT-QuIC 法を実施) したところ、Round-2 においても rHaPrP は C-BSE に反応しなかった。それに対して rMoPrP および rHaPrP は L-BSE に高い反応を示した。しかし、C-BSE の rPrP 種特異性は、RT-QuIC を 4~5 回連続することで消失した。従って、Round-2 まで含めた rMoPrP と rHaPrP の反応性の違いを利用すれば、RT-QuIC 法によって L-BSE と C-BSE の鑑別が可能となる。

また、ステンレススチールワイヤーに付着したプリオンの活性を2日間程度で評価できるWire-QuIC法を開発した。この方法により、RT-QuIC法の適用範囲の拡大が期待できる。

3-3) 非定型 BSE 試料の熱処理や化学処理が C-BSE を誘発する可能性の検討

熱処理により L-BSE 由来 PrP^{Sc} が C-BSE 由来 PrP^{Sc} 様の性状を獲得するかを調べるために、L-BSE 感染脳乳剤を加熱処理した。70°C では白濁した状態を維持していたが、100°C 以上で固形分の凝集が見られた。135°C 以上では液状部分が透明となり、150°C では黄褐色に変色した。WB では、70°C から 110°C まで明瞭な PrP^{Sc} のバンドが確認され、分子量およびバンドパターンに変化はなかった。加熱処理した L-BSE 感染脳を、C-BSE の PrP^{Sc} を増幅する PMCA 法により PrP^{Sc} 増幅を試みたが、C-BSE 様の PrP^{Sc} は検出されなかった。

化学処理により L-BSE 由来 PrP^{Sc} が C-BSE 由来 PrP^{Sc} 様の性状を獲得するかを調べるために、10% L-BSE 感染脳乳剤を、2 規定 (N) から 2 倍階段希釈 (2 ~ 1/16N) した等量の塩酸または水酸化ナトリウムで処理した後、C-BSE の PrP^{Sc} を増幅する PMCA 法により PrP^{Sc} 増幅を試みた。いずれの処理条件でも、C-BSE 様の PrP^{Sc} は検出されなかった。

3-4) カニクイザルで増殖した C-, L-BSE プリオンの特性変化の検証

C-BSE プリオンや L-BSE プリオンが、ウシから異種動物へ伝播した場合に、そのウイルス学的特徴に変化が起こるのかという点を検討することは、プリオン株の起源や新たなプリオン株の出現を考察・予測する上で意義深い。霊長類モデルであるカニクイザルへ伝播した C-, L-BSE プリオンの病原性の変化の有無を、近交系マウスに対する病原性を比較することで調べた。その結果、カニクイザルで増殖した C-, L-BSE プリオンの病原学的特性は、ウシ脳の C-, L-BSE プリオンと大差なかったことから、仮に L-BSE がヒトに感染したとしても、すぐに vCJD のような病態を呈することはないことが示唆される。

D. 考察

1) 非定型 BSE 感染動物における感染病態機序の解明

接種後 4.7 ヶ月の脳内接種 L-BSE 感染牛 2 頭に蓄積する PrP^{Sc} は、脳幹部に局限し、蓄積量もわずかであった。これより前の段階では PrP^{Sc} は検出されなかった。接種後 7.5 月では脳内の PrP^{Sc} 蓄積部位が広がっていた。脳内接種による L-BSE 感染牛の臨床症状が接種後 11 ヶ月頃から確認されることから、臨床症状が出現する約 6 ヶ月前、あるいは病末期の約 11 ヶ月前に PrP^{Sc} を検出できることが示唆された。また、嗅脚は L-BSE の PrP^{Sc} が蓄積しやすい部位の一つであることから、原因不明の死亡牛の検査では、この部位を採材することで、確実に L-BSE を摘発できると思われる。

本研究で作出した、C-BSE モルモット馴化株 (C-BSE/gu)、L-BSE ハムスター馴化株 (L-BSE/ham) は、BSE の起源の推定を含めて、今後の研究の有用なツールとなる。特に C-BSE/gu は世界初の例であり、特徴的な小脳病変を示すことから、BSE のみならずヒトプリオン病の病態モデルとしても有用と思われる。L-BSE ハムスター馴化モデルでは脳内で増幅した PrP^{Sc} が神経性あるいは血行性に脊髄へ伝播することは示唆された。末梢神経や血液を介した末梢組織への遠心性伝播は確認されなかった。L-BSE の末梢神経、他臓器への親和性を欠くことは L-BSE 起源を考える上で重要と思われる。

C-BSE 由来 PrP^{Sc} の見かけ上の分子量が、高温消化条件で大きくなる現象を見出した。このメカニズムは不明であるが、本現象は C-BSE プリオンの判別法として有用と思われる。ただし、新たに生じた PrP^{Sc} 断片と、通常の消化条件で得られる PrP^{Sc} 断片との感染性や病原性を検討して C-BSE の生物性状を維持しているか確認する必要はある。

PrP^{Sc} 特異抗体 mAb8D5 と mAb132 はプリオン病の神経病態解析用のツールとして可能性を秘めている。しかし、mAb8D5 は非感染牛の脳組織の特定の部位でシグナルが認められたことから、残念ながら牛の脳組織の解析には応用が難しい。抗 PrP 抗体 mAb132 はエピトープの密度が高くなると反応性が向上するため、PrP を過発現するマウスでは PrP^C 由来のシグナルを検出する可能性

が予想されたが、嗅球を除いては TgBovPrP の脳組織における PrP^{Sc} の解析に使用可能であると思われる。

mAb132 を用いる PrP^{Sc} 特異検出法と、フローサイトメトリーの解析法を工夫することで、プリオン感染動物の脳からプリオンに感染した神経細胞を検出することが可能になった。世界で初めての技術であり、今後、セルソーターを用いて、プリオン感染神経細胞を分取し、プロテオームやトランスクリプトームを行うことで、プリオンに感染した神経細胞で生じる変化をより特異的に解析することが可能となる。また、mAb 132 のエピトープはほ乳類から鳥類まで保存されていることから、本法はマウスのみならず、多くの動物種に応用可能と考えられる。

C-, L-, および H-BSE プリオン感染 TgBovPrP の脳幹のトランスクリプトームでは、3 種の BSE プリオン感染で共通して発現が上昇するのは、主にミクログリアで発現が上昇する遺伝子群であった。つまり、ミクログリアの活性化は BSE プリオンの種類を問わず共通の現象であることが示された。一方で、C-, L- あるいは H-BSE プリオンの感染に対して特異的に発現が上昇する遺伝子群の存在を明らかにした。ミクログリアが同じように活性化する一方で、C-, L-, および H-BSE プリオンの感染に対する宿主の反応の違いは、プリオン病の神経変性機構を考える上で非常に興味深い現象である。

2) 非定型 BSE のヒトへのリスクの推定

L-BSE を経口接種して 3 年を過ぎた時点で、カニクイザル 2 頭の体液から、一過性であるが PrP^{Sc} が検出されたことは、L-BSE は経口的にヒトに感染するリスクがあることを示していることから、管理措置の継続等、適切な対応が望まれる。

L-BSE の臨床症状期の牛の筋組織（筋紡錘）における PrP^{Sc} の分布を明らかにした。この事実は、L-BSE の臨床症状期の牛の筋組織（上腕三頭筋、半腱様筋、大腰筋、最長筋）にプリオン感染性が検出されたことと矛盾しない。筋組織は脳と比べて 1/10,000 程度の感染価を有していると推定できた。これまでにイタリアでの自然発生例でも、筋組織に感染性が分布することが報告されている。

感染価は低い、L-BSE は経口ルートでヒトへ感染するリスクがあることから、特定部位以外にも L-BSE プリオンが存在し得るという前提で、慎重な対応が必要と思われる。

新たに作製した TgHuPrP を用いた、C-, L-, および H-BSE の接種試験では、ヒトの感受性は L-BSE, C-BSE, H-BSE の順に低下することが示唆された。接種に用いた L-BSE や H-BSE の感染価は $10^{0.3}$ 倍の僅かな差しかないにもかかわらず、L-BSE は TgHuPrP に感染したが H-BSE は感染しなかったことから、H-BSE プリオンのヒトへの感染リスクは低いと考えられる。しかし、現在進行中のカニクイザルを用いた H-BSE 感染実験の結果と合わせて判断する必要がある。

3) 潜在的な非定型 BSE の存在リスクの推定、非定型 BSE が C-BSE の起源となる可能性の推定

rCerPrP を基質に用いて、RT-QuIC の反応系に非感染牛脳乳剤を添加することで、一回の RT-QuIC 反応で、検出感度を損なうことなく、C-BSE と L-BSE を鑑別可能となった。rCerPrP 以外に、マウス、ハムスター、ウシ、およびハタネズミの組換え PrP を使用したが、被検試料の脳乳剤濃度が最高となる 10^{-3} 希釈でも安定して陽性となり、かつ 10^{-7} 希釈まで再現性良く陽性となるのは rCerPrP を基質とした RT-QuIC であった。これまで rCerPrP を基質とした BSE 検出系は報告されていないが、rCerPrP は BSE プリオンの増殖に有効であると考えられる。

最近アメリカの研究グループが種々の rPrP (Bank vole や Sheep) を用いた RT-QuIC 法において、反応性の違いから C-, L-, および H-BSE を鑑別可能であることを報告している (Masujin et al., 2016)。この方法は、高濃度の組織乳剤存在下での検討は行われておらず、高感度検出と鑑別の両方を備えた実用的な方法には至っていない。

非定型 BSE のプリオンに何らかの変化が生じて C-BSE プリオンが生じる可能性を探るため、本研究では、熱処理、および酸・アルカリ処理により L-BSE 由来 PrP^{Sc} が、C-BSE 様の PrP^{Sc} に変化する可能性を調べた。この際、C-BSE 由来 PrP^{Sc} を選択的に増幅する PMCA 法を応用して、僅かに生じるかもしれない C-BSE 様 PrP^{Sc} の検出を試みたが、L-BSE プリオンが C-BSE 様のプリオンに変化

する現象を再現することが出来なかった。従って、L-BSE が単純な加熱や酸・アルカリ等の物理・化学的処理によって C-BSE 様のプリオンに変化する可能性は低いと考えられた。

本研究では、L-BSE プリオンが、vCJD のようなヒトプリオン病の原因となり得るかを推測するために、カニクイザルに伝達した C-BSE と L-BSE プリオンの病原学的性状を調べたが、ウシ脳の C-, L-BSE プリオンと大差なかったことから、仮に L-BSE がヒトに感染したとしても、vCJD のような病態を呈する可能性は低いと思われる。

E . 結論

1) 非定型 BSE 感染動物における感染病態機序の解明

- ・ 非定型 L 型 BSE 感染牛の臨床症状が確認される約 6 ヶ月前頃から PrP^{Sc} が検出されることが明らかとなった。
- ・ L-BSE 感染牛における PrP^{Sc} の脳内分布が改めて確認できた。嗅脚で早期から PrP^{Sc} が検出されることから、原因不明の死亡牛の検査では、嗅脚などを採材することで、確実な摘発が可能になるとと思われる。
- ・ BSE 解析用のモデルとして、C-BSE モルモット馴化株 (C-BSE/gu)、L-BSE ハムスター馴化株 (L-BSE/ham) を作出した。
- ・ L-BSE は末梢組織への親和性が低いこと、血行性あるいは血管周囲器官を介して中枢神経系組織内で拡散する可能性が示唆された。
- ・ C-BSE の PrP^{Sc} が熱処理により PrP^{Sc} の分子サイズが変化するという、これまでに報告がない生化学的特徴を見出した。
- ・ プリオン感染動物脳から、プリオン感染神経細胞を同定・分離する方法を世界で初めて確立した。
- ・ C-, L-, および H-BSE プリオン感染 TgBovPrP の比較から、3 種の BSE プリオンに共通した宿主応答、およびそれぞれの BSE プリオンに特長的な宿主応答があることを明らかにした。

2) 非定型 BSE のヒトへのリスクの推定に資する研究

- ・ L-BSE を経口接種したカニクイザルの 2 頭ともが、接種後 3 年経過した時点で、一過性ではあるが体液から PrP^{Sc} が検出された。L-BSE は経口的にヒトに感染するリスクがあることを示唆する重要な結果である。
- ・ TgHuPrP マウスへの伝達試験の結果から、ヒトの BSE プリオンの感受性は、L-BSE > C-BSE > H-BSE と推測され、H-BSE のヒトへの感染リスクは低いと考えられた。
- ・ L-BSE 感染牛の可食部 (骨格筋：上腕三頭筋、半腱様筋、大腰筋、最長筋) に脳の 1/10,000 程度の感染価が存在することを明らかにした。
- ・ BSE スクリーニング検査に使用されている市販キットが、H-BSE ウシの摘発に有効であることを確認した。

3) 潜在的な非定型 BSE の存在リスクの推定、非定型 BSE が C-BSE の起源となる可能性の推定

- ・ rCerPrP を用いることで、C-BSE と L-BSE プリオンの高感度検出および鑑別を一回の反応で実施可能な RT-QuIC 法を確立した。C-, L-, および H-BSE を 1 度で検出・鑑別する方法の確立には至らなかった。
- ・ rMoPrP と rHaPrP に対する C-BSE と L-BSE の反応性の差を利用して、両者を高精度に鑑別する方法を確立した。
- ・ L-BSE プリオンが、単純な加熱や酸・アルカリ等の物理・化学的処理によって C-BSE 様のプリオンに変化する可能性は低いと考えられた。

F . 健康危険情報 該当なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

- II. 研究成果に刊行物一覧を、また、代表的な論文を選択して掲載した。

2.学会発表

- 件数が多いため割愛した。各年度の総括・分担研究報告書に記載した通りである。

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし

2. 実用新案登録